

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-059678
(43)Date of publication of application : 05.03.1996

(51)Int.Cl.

C07F 9/10

(21)Application number : 06-329274

(71)Applicant : NIPPON OIL & FATS CO LTD
RIKAGAKU KENKYUSHO

(22)Date of filing : 05.12.1994

(72)Inventor : HIBINO HIDEHIKO
FUKUDA NOBUO
NAKACHI OSAMU
SAKURAI SHIGERU
ASAHI KENICHI
TAKAHASHI NOBUTAKA

(54) PRODUCTION OF DOCOSAHEXAENOYLPHOSPHATIDYL CHOLINE

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a method for producing phosphatidyl choline containing docosahexaenoic acid at the sn-2 position economically in high yield by a process as simple as possible.

CONSTITUTION: In producing docosahexaenoylphosphatidyl choline containing docosahexaenoic acid at the sn-2 position, roe of aquatic animal is used as a raw material and extracted with an organic solvent to give total phospholipid, from which phosphatidyl choline is separated. Consequently, docosahexaenoic acid-containing phosphatidyl choline useful as a physiologically active substance to be watched as a constituent lipid for a brain/nervous system and as a lipid controlling physical properties of a plasma membrane taking part in cell differentiation can be obtained in high yield by purifying the roe of aquatic animal as the raw material while maintaining natural stereoisomerism without carrying out a specific synthesis.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 05.12.1994

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 2717517

[Date of registration] 14.11.1997

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

**Japanese Unexamined Patent Publication
No. 59678/1996 (*Tokukaihei 8-59678*)**

A. Relevance of the Above-identified Document

The following is a partial English translation of exemplary portions of non-English language information that may be relevant to the issue of patentability of the claims of the present application.

B. Translation of the Relevant Passages of the Document

See also the attached English Abstract.

[0007]

[MEANS TO SOLVE THE PROBLEMS]

The present invention separates phosphatidylcholine from total phospholipids that are obtained by solvent extraction of eggs of marine animals used as a source material...

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-59678

(43)公開日 平成8年(1996)3月5日

(51)Int.Cl.⁶

C 07 F 9/10

識別記号 庁内整理番号

A 9155-4H

F I

技術表示箇所

審査請求 有 発明の数1 FD (全6頁)

(21)出願番号 特願平6-329274
(62)分割の表示 特願昭62-318617の分割
(22)出願日 昭和62年(1987)12月18日

(71)出願人 000004341
日本油脂株式会社
東京都渋谷区恵比寿四丁目20番3号
(71)出願人 000006792
理化学研究所
埼玉県和光市広沢2番1号
(72)発明者 日比野 英彦
東京都練馬区旭丘2丁目22番1号
(72)発明者 福田 信雄
茨城県つくば市梅園2-24-5
(72)発明者 仲地 理
茨城県牛久市下根町1044-10番地
(74)代理人 弁理士 舟橋 栄子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ドコサヘキサエノイルホスファチジルコリンの製造法

(57)【要約】

【目的】 経済的に高収率にて、出来るだけ簡単な工程により s_{n-2} 位にドコサヘキサエン酸を含むホスファチジルコリンを製造する方法を提供する。

【構成】 s_{n-2} 位にドコサヘキサエン酸を有するドコサヘキサエノイルホスファチジルコリンの製造にあたり、水産動物の卵を原料として溶媒抽出により得られた総リン脂質からホスファチジルコリンを分離することを特徴とする。

【効果】 水産動物の卵を原料として精製処理することにより、脳・神経系の構成脂質、細胞分化に関与する形質膜の物性を支配する脂質等で注目される生理活性物質として有用なドコサヘキサエン酸含有ホスファチジルコリンを、特別な合成をせず、しかも天然の立体特異性を維持したまま、高収率で得ることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 $s n - 2$ 位にドコサヘキサエン酸を有するドコサヘキサエノイルホスファチジルコリンの製造にあたり、水産動物の卵を原料として溶媒抽出により得られた総リン脂質からホスファチジルコリンを分離することを特徴とするドコサヘキサエノイルホスファチジルコリンの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は $s n - 2$ 位にドコサヘキサエン酸を有するホスファチジルコリンを製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】ドコサヘキサエン酸はエイコサペンタエン酸と同様に、コレステロール及び中性脂質低下作用も大きく、その生理的重要性が認められるようになった。一方、生化学分野の進歩によりドコサヘキサエン酸は脳や神経系の構成脂質であるリン脂質中で何らかの作用を司っていることが示唆されている。また形質膜の物性を支配するリン脂質中のドコサヘキサエン酸が細胞分化の因子として注目され、これらの中にはドコサヘキサエン酸を含有するホスファチジルコリンに強い関心が集まっている。

【0003】ドコサヘキサエン酸やアラキドン酸の様な高度不飽和脂肪酸は、生体組織においては脂肪の豊富な脂肪組織中のトリアシルグリセロールやコレステロールエステル中には少なく、微量成分である細胞膜の構成成分中の極性脂質に偏在している。特に、ドコサヘキサエン酸に関しては脳の髓鞘、視神経の桿体等の脳神経系にエステル型のホスファチジルコリンやホスファチジルエタノールアミンおよびエーテル型のホスファチジルコリンやホスファチジルエタノールアミンに多いことが知られている。また鶏卵の卵黄脂質中のリン脂質のホスファチジルコリンやホスファチジルエタノールアミンに数%含まれている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】このようにドコサヘキサエン酸を含むホスファチジルコリンは生体の特殊な部位に存在するが、その部位のみを特異的に採取する事は難しく、また、その含有量は非常に少なく適当な原料がない。例えば、入手が容易な市販卵黄レシチン中のリン脂質のホスファチジルコリンやホスファチジルエタノールアミンに、ドコサヘキサエン酸が数%含まれていることが知られている（東京化学同人社、生化学実験講座3、脂質の化学 257頁）。しかし、ホスファチジルコリンやホスファチジルエタノールアミンを個々に単離して、各々のドコサヘキサエン酸量を定量すると、卵黄レシチンのリン脂質に存在するドコサヘキサエン酸はホスファチジルエタノールアミンに局在し、ホスファチジルコリン中にはあまり含まれていない。そのため卵黄レシ

チン中のホスファチジルコリンからドコサヘキサエン酸を含むホスファチジルコリンを効率良く分離するには特別な工夫が必要である。

【0005】ドコサヘキサエン酸を含むホスファチジルコリンが、生体膜において生理的役割、例えばホルモン作用の発現（秋野豊明、油化学 30、705(1981)）を果たすには、ドコサヘキサエン酸がホスファチジルコリンの $s n - 2$ 位に、パルミチン酸やオレイン酸の様な飽和モノエン酸がホスファチジルコリンの $s n - 1$ 位に結合していることが重要である。しかしながらドコサヘキサエン酸をホスファチジルコリンの $s n - 1$ 位と $s n - 2$ 位に結合するにはグリセロホスホリルコリンの塩化カドミウム錯体にドコサヘキサエン酸の酸無水物やハロゲン化合物を反応させればよいが、 $s n - 2$ 位にドコサヘキサエン酸を結合した状態で $s n - 1$ 位にドコサヘキサエン酸以外の脂肪酸を結合させるにはこの様な直接反応では難しいのが現状である。

【0006】従って、本発明の目的は、経済的に高収率にて、出来るだけ簡単な工程により $s n - 2$ 位にドコサヘキサエン酸を含むホスファチジルコリンを製造する方法を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明は、 $s n - 2$ 位にドコサヘキサエン酸を有するドコサヘキサエノイルホスファチジルコリンの製造にあたり、水産動物の卵を原料として溶媒抽出により得られた総リン脂質からホスファチジルコリンを分離することを特徴とする。以下、本発明につき更に詳細に説明する。

【0008】本発明者らは脂質が豊富で、構成脂肪酸中にドコサヘキサエン酸を多量に含む水産動物の卵の脂質を詳細に検討した。天然脂質原料の脂肪組成は系統発生系とは関係なく、環境因子が重要であり、特に動物ではその食餌環境が同一である場合、その組成は著しく類似することが知られている。即ち、ドコサヘキサエン酸は植物性原料からは見出し難く、動物性原料でも陸上動物よりも水産動物から見出されるので、これらの動物の卵が原料として好ましい。天然原料にはシャケやニシン等の水産動物の卵が入手が容易であり、また養殖が盛んな、ハマチ、コイ、ウナギ、ニジマス、クルマエビ等の卵も原料として好ましい。

【0009】原料となる水産動物の卵は可能な限り新鮮であることが望ましく、採取後直ちに冷凍、凍結乾燥または真空乾燥処理した原料を使用すると、原料中の酸価の上昇、得られる目的物の過酸化物価の上昇による品質低下を避けることができ、良質な目的物を得ることが出来る。目的物中に過酸化物が存在すると生体中において細胞障害を引き起こす原因となり、高度不飽和脂肪酸の過酸化反応は共役ジエンの生成を伴うため二重結合の移動を生じる。

【010】原料（水産動物由来の卵）を精製処理する

には、新鮮な材料を無酸素状態下に溶剤抽出することが好ましい。その際、材料に対して例えば蒸留水およびメタノールークロロホルム系溶媒、アセトン、エーテル、ヘキサン等の溶剤を加え、必要に応じてその混合物をロウルデス・ホモジナイザー、ソルバル・オムニミキサー、ワーリングブレンダー、ポッター・エルベージュム・ガラスホモミキサー等によってホモジナイズする。無酸素状態下として、例えば真空中、窒素気流下および二酸化炭素気流下に、0°C~60°C、10~180分間、溶剤抽出することが出来る。溶剤は水産動物の卵1部に対し1~5部添加するのが好ましい。

【0011】溶剤抽出した粗脂質からホスファチジルコリンを分離する方法として例えば次の様な方法がある。粗脂質を冷アセトン処理して総リン脂質を分画してからカラムクロマト法で分離する方法、粗脂質を冷アセトン処理して総リン脂質を分画してからマグネシウム塩を加えてリン脂質マグネシウム錯体として濾別分離する方法、粗脂質を冷アセトン処理して総リン脂質を分画してエタノール系溶媒による溶剤分別する方法、粗脂質を直接シリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン→クロロホルム→メタノールと溶媒の混合比率を無極性から極性へ変化させながら分離する方法等である。

【0012】

【発明の効果】本発明の方法によれば、水産動物の卵を原料として精製処理することにより、脳・神経系の構成脂質、細胞分化に関与する形質膜の物性を支配する脂質等で注目される生理活性物質として有用なドコサヘキサエン酸含有ホスファチジルコリンを、特別な合成をせず、しかも天然の立体特異性を維持したまま、高収率で得ることができる。さらに無酸素下状態で処理するときは、細胞障害の原因となる過酸化脂質の產生を抑制したままドコサヘキサエン酸含有ホスファチジルコリンを得ることができる。

【0013】

【実施例】以下、実施例により本発明を具体的に説明する。

実施例1

採卵後直ちに冷凍したニジマスの卵を窒素気流下で解凍した。この原料1300gをアセトン2リットルに入れ、窒素気流下、T.H.ホモミキサー（特殊機工工業製）で荒くホモゲナイズしてからエクセル・オート・ホモゲナイザー（日本精器製作所製）で氷冷状態下30分ホモゲナイズした。

【0014】懸濁液をブッフナー漏斗で濾過し、濾液と湿ケーキに分けた。濾液からアセトン抽出物10gを得た。乳灰色の湿ケーキ830gをエチルエーテル3リットルに入れ、スリーウンモータータイプ600GM（新東科学製）で200rpmで回転しながら30分間抽出した。懸濁液をブッフナー漏斗で濾過し、濾液と湿ケーキに分けた。濾液からエチルエーテル抽出物48gを得た。

【0015】乳灰色の湿ケーキ770gをクロロホルム-メタノール(1/1, vol/vol)混液1リットルで2回、分液漏斗中で抽出した。懸濁液をブッフナー漏斗で濾過し、濾液と湿ケーキに分けた。濾液からクロロホルム-メタノール抽出物55gを得た。乳灰色の湿ケーキ690gをクロロホルム-メタノール(2/1, vol/vol)混液1.5リットルで2回、分液漏斗中で抽出した。懸濁液をブッフナー漏斗で濾過し、濾液と湿ケーキに分けた。濾液からクロロホルム-メタノール抽出物を5g得た。各抽出物を一緒にした。得られた粗脂質量は118gであった（対原料収率9.1%）。粗脂質の全量をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（シリカ60、和光純薬製：8Φ×40cmカラムに2リットル）に付した後、ヘキサン中にクロロホルムの比率を上げていく溶離液系で中性脂質を除去した。中性脂質の回収量69gで、組成は薄層クロマトグラフィー（展開溶媒：ヘキサン-エチルエーテル-酢酸50/50/1, vol/vol/vol）分析でトリアシルグリセロールが主体であった。

【0016】中性脂質を除いたカラムに、クロロホルム中にメタノールの比率を上げていく溶離液系を流した。クロロホルム対メタノールの比率が35:65~25:75の範囲にホスファチジルコリンを主成分とする区分が溶出し、脱溶媒後28gのホスファチジルコリンを得た。ホスファチジルコリン区分の判定は薄層クロマトグラフィー（展開溶媒：クロロホルム-メタノール-水 65/25/4, vol/vol/vol）で行った。薄層クロマトグラフィー上のRf値0.20~0.30（ホスファチジルコリン）にシングルスポットのみが認められる分画を集めて、窒素気流下で脱溶媒を行い、純ホスファチジルコリンを19g得た。

【0017】分取されたホスファチジルコリンを三沸化ホウ素メタノール法でメチルエステル化し、キャビラリーカラムガスクロマトグラフィー（液相：カーボワックス-20M、25m、170°C）で脂肪酸組成を測定した。その結果、ドコサヘキサエン酸は46%でパルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸が各約10%を占めていた。このホスファチジルコリンをホスホリバーゼA₂で加水分解し、三沸化ホウ素メタノール法でメチルエステル化し、キャビラリーカラムガスクロマトグラフィーで脂肪酸組成を測定した。その結果、ドコサヘキサエン酸は80%であった。

【0018】次にホスファチジルコリンの分子種を分析するため、FAB-MS(Pos.)で分子量Mに相当するm/zを測定した。その結果、m/z 806(パルミトイルドコサヘキサニルホスファチジルコリンに相当)、m/z 832(オレオイルドコサヘキサニルホスファチジルコリンに相当)、m/z 834(ステアロイルドコサヘキサニルホスファチジルコリンに相当)が強く認められた。

【0019】ホスファチジルコリン中のアルキル鎖の分布を分析するため、高速液体クロマトグラフィー（シヨーデックスODSpak F-611A）にメタノール(1

ml/min)で展開し、 $\text{UV} 210\text{nm}$ でモニターした。その結果、一本のメインピークと数本の小さなピークが認められ、このホスファチジルコリンのアルキル鎖の分布は少なかった。ホスファチジルコリンの過酸化脂質量は電位差滴定法(自動滴定装置G T - 05、三菱化成工業(株)製)で測定した。原材料の魚卵粗脂質の過酸化物量が $1.2.3\text{meq./kg}$ であるのに対し、ホスファチジルコリン画分は 18.4meq./kg であった。

【0020】実施例2

採卵後直ちに冷凍したニジマスの受精卵を窒素気流下で解凍した。この原料 1500g をクロロホルム/メタノール(2/1, vol/vol)混液6リットルに入れ、窒素気流下、T.H.ホモミキサー(特殊機工工業製)で高速で剪断抽出しながら氷冷状態下30分間ホモゲナイズした。

【0021】懸濁液をブッフナー漏斗で濾過し、濾液と乳灰色の湿ケーキに分けた。乳灰色の湿ケーキ 910g を上記溶媒2リットルに入れ、上記と同一の条件で処理した。同様に懸濁液から濾液と湿ケーキに分けた。乳灰色の湿ケーキ 780g を上記溶媒2リットルに入れ同一条件で処理した。さらに、3回目の懸濁液から濾液と湿ケーキの濾別を行った。全濾液を集めて遠心分離し、上澄液にクロロホルム3リットルと蒸留水3リットルを加えて、よく水洗した後、遠心分離で二層に分離した。

【0022】下層のクロロホルム層を集めて、窒素気流下、ロータリーエバボレーターを用い、 30°C で濃縮し、溶媒留去の最後にベンゼン 100ml を加えて脱水を行ながら脱溶媒した。溶媒を留去した抽出物を真空デシケーターで一昼夜乾燥して得られた全粗脂質の重量は、 127g (対原料収率8.5%)であった。得られた全粗脂質を氷冷アセトン1.3リットル中に入れ、窒素気流下、スリーワンモータータイプ600 GM(新東科学製)で 200rpm で回転しながら10分間抽出した。アセトン懸濁液を冷却したブッフナー漏斗で濾過し、沈殿を回収した。この沈殿に、上記同様の冷アセトン処理を4回繰り返して、完全に中性脂質を除いた総リン脂質分画 57g (粗脂質中45.2%)を得た。

【0023】総リン脂質全量をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(富士ゲルCG-3、水戸化学製、 $5\phi \times 40\text{cm}$ カラムに 700cc)に付した後、クロロホルム-メタノール(4/1, vol/vol)混液の溶離液系でホスファチジルコリン以前に溶出するホスファチジルエタノールアミン等のリン脂質を除去した。さらに純粋なホスファチジルコリンを分画するためクロロホルム-メタノール(3/2, vol/vol)混液の溶離液系で溶出させた。溶離液 500ml ずつを分画し、各分画を薄層クロマトグラフィー(展開溶媒:クロロホルム-メタノール-水 $65/25/4$, vol/vol/vol)で測定した。各分画の内、薄層クロマトグラフィーでRF値 $0.20 \sim 0.35$ (ホスファチジルコリン)にシングルスポットのみが認められる分画 19g を得た。

【0024】分取されたホスファチジルコリンを三弗化

ホウ素メタノール法でメチルエステル化し、キャビラリーカラムガスクロマトグラフィー(液相:カーボワックス-20M, 25m, 170°C)で脂肪酸組成を測定した。その結果、ドコサヘキサエン酸は45%でパルミチン酸、ステアリン酸およびオレイン酸が、各約10%を占めていた。

【0025】このホスファチジルコリンをホスホリバーゼA₁で加水分解し、三弗化ホウ素メタノール法でメチルエステル化し、キャビラリーガスクロマトグラフィーで脂肪酸組成を測定した。その結果ドコサヘキサエン酸は78%であった。次に、ホスファチジルコリンの分子種を分析するため、FAB-MS(Pos.)で分子量に相当するm/zを測定した(第1図)。得られた質量スペクトルはm/z 806(パルミトイルドコサヘキサエニルホスファチジルコリンに相当)、m/z 832(オレオイルドコサヘキサエニルホスファチジルコリンに相当)およびm/z 834(ステアロイルドコサヘキサエニルホスファチジルコリンに相当)が強く認められた。ホスファチジルコリン中のアルキル鎖の分布を分析するため、ODSカラム(ショーデックスODS pak F-611 A、昭光通商製)を装備した高速液体クロマトグラフィーに、メタノール($1\text{ml}/\text{min}$)で展開し、 $\text{UV} 210\text{nm}$ でモニターした。得られたクロマトグラムは一本のメインピークと数本の小さなピークが認められ、このホスファチジルコリンのアルキル鎖の分布は少なかった。ホスファチジルコリンの過酸化脂質量は、 18.7meq./kg であった。

【0026】実施例3

採卵後直ちに冷凍したサケの卵(イクラ)を窒素気流下で解凍した。この原料 500g にクロロホルム/メタノール(2/1, vol/vol)混液2リットルを加え、ホモミキサーで充分に混和した後、濾過し、窒素気流下で残渣を同混液1リットルで2回同様の操作を行った。濾液を合わせ、水洗した後、溶媒を留去して、真空デシケーター中に3時間乾燥して得られた粗脂質の重量は、 73.5g (対原料収率14.7%)であった。

【0027】得られた全粗脂質を氷冷アセトン0.4リットル中に入れ、窒素気流下で回転しながら10分間抽出した。アセトン懸濁液を冷却したブッフナー漏斗で濾過し、沈殿を回収した。この沈殿に、上記同様の冷アセトン処理を4回繰り返して、完全に中性脂質を除いた総リン脂質分画 23.7g (粗脂質中32.2%)を得た。総リン脂質全量をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(富士ゲルCG-3、水戸化学製、 $5\phi \times 40\text{cm}$ カラムに 400cc)に付した後、クロロホルム-メタノール(3/2, vol/vol)混液の溶離液系でホスファチジルコリン以前に溶出するホスファチジルエタノールアミン等のリン脂質を除去した。

【0028】さらに、純粋なホスファチジルコリンを分画するため、同混液の溶離液系で溶出させた。溶離液 500ml ずつを分画し、各分画を薄層クロマトグラフィー

(展開溶媒：クロロホルム-メタノール-水 65/25/4, vol/vol/vol) で測定した。各分画のうち、薄層クロマトグラフィーで、Rf値0.20~0.35 (ホスファチジルコリン) にシングルスポットが認められる分画6.1gを得た。

【0029】分取されたホスファチジルコリンを三沸化ホウ素メタノール法でメチルエステル化し、キャビラリーカラムガスクロマトグラフィー(液相：カーボワックス-20M, 25m, 170 °C) で脂肪酸組成を測定した。その結果、ドコサヘキサエン酸31%で、パルミチン酸、ステアリン酸およびオレイン酸が、各約10%を占めていた。

【0030】このホスファチジルコリンをホスホリバーゼA₂で加水分解し、三沸化ホウ素メタノール法でメチルエステル化し、キャビラリーガスクロマトグラフィーで脂肪酸組成を測定した。その結果ドコサヘキサエン酸は58%であった。次にホスファチジルコリンの分子種を分析するため、FAB-MS(Pos.)で分子量に相当するm/zを測定した。得られた質量スペクトルはm/z 806(パルミトイルドコサヘキサエニルホスファチジルコリンに相当)、m/z 832(オレオトイルドコサヘキサエニルホスファチジルコリンに相当)およびm/z 834(ステアロトイルドコサヘキサエニルホスファチジルコリンに相当)が強く認められた。ホスファチジルコリン中のアルキル鎖の分布を分析するため、ODSカラム(ショーデックスOD Spak F-611 A、昭光通商製)を装備した高速液体クロマトグラフィーにメタノール(1ml/min)で展開し、UV 210nmでモニターした。得られたクロマトグラムは一本のメインピークと数本の小さなピークが認められ、このホスファチジルコリンのアルキル鎖の分布は少なかった。ホスファチジルコリンの過酸化脂質量は、12.4meq./kgであった。

【0031】実施例4

ニシンの卵500gを実施例1と同様に溶剤処理して粗脂質14g(対原料収率2.8%)を得た。この粗脂質の全量をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(キーゼルゲル60、メルク社製、4φ×40cmカラム0.4リットル)に付した後、クロロホルムを中性脂質が出なくなるまで流して、さらにメタノールを流してリン脂質画分の溶媒を留去した。得られた総リン脂質分画は8.3g(粗脂質中59.2%)であった。

【0032】中性脂質を除いた上記カラムに、クロロホルム-メタノール(3/2 vol/vol)混液の溶離液を用いて、薄層クロマトグラフィーで、Rf値0.20~0.35のシングルスポットを示す純ホスファチジルコリン分画3.1gを得た。このホスファチジルコリンを実施例1と同様に分析したところ、脂肪酸組成としてドコサヘキサエン酸を40%含有しており、また、ホスホリバーゼA₂で加水分解して得たsn-2位の脂肪酸組成は、ドコサヘキサエン酸を81%含有していた。また、過酸化脂質量は10.2

meq./kgであった。

【0033】卵ホスファチジルコリンは、逆相分配カラムクロマトグラフィー、質量分析計およびホスホリバーゼA₂の解析から、このホスファチジルコリンの主成分の分子種がドコサヘキサエン酸をsn-2位に結合するホスファチジルコリンであることがわかった。即ち、魚卵ホスファチジルコリンの主成分はsn-2位にドコサヘキサエン酸を有するホスファチジルコリンである。

【0034】実施例5

- 10 採卵後直ちに冷凍したクルマエビの卵を窒素気流下で解凍した。この原料1000gをアセトン1.5リットルに入れ、窒素気流下、T.H.ホモミキサー(特殊機工工業製)で荒くホモゲナイズしてからエクセル・オート・ホモゲナイザー(日本精器製作所製)で氷冷状態下30分ホモゲナイズした。
- 【0035】懸濁液をブッフナー漏斗で濾過し、濾液と湿ケーキに分けた。濾液からアセトン抽出物7gを得た。乳灰色の湿ケーキ630gをエチルエーテル2.5リットルに入れ、スリーワンモータータイプ600GM(新東科学製)で200rpmで回転しながら30分間抽出した。懸濁液をブッフナー漏斗で濾過し、濾液と湿ケーキに分けた。濾液からエチルエーテル抽出物35gを得た。

- 20 【0036】乳灰色の湿ケーキ580gをクロロホルム-メタノール(1/1, vol/vol)混液1リットルで2回、分液漏斗中で抽出した。懸濁液をブッフナー漏斗で濾過し、濾液と湿ケーキに分けた。濾液からクロロホルム-メタノール抽出物40gを得た。乳灰色の湿ケーキ535gをクロロホルム-メタノール(2/1, vol/vol)混液1.5リットルで2回、分液漏斗中で抽出した。懸濁液をブッフナー漏斗で濾過し、濾液と湿ケーキに分けた。濾液からクロロホルム-メタノール抽出物4gを得た。各抽出物と一緒にした。得られた粗脂質量86gであった(対原料収率8.6%)。

- 30 【0037】粗脂質の全量をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(シリカ60、和光純薬製: 8φ×40cmカラムに2リットル)に付した後、ヘキサン中にクロロホルムの比率を上げていく溶離液系で中性脂質を除去した。中性脂質の回収量54gで、組成は薄層クロマトグラフィー(展開溶媒: ヘキサン-エチルエーテル-酢酸 50/50/1, vol/vol/vol)分析でトリアシルグリセロールが主体であった。

- 40 【0038】中性脂質を除いたカラムに、クロロホルム中にメタノールの比率を上げていく溶離液系を流した。クロロホルム対メタノールの比率が35:65~25:75の範囲にホスファチジルコリンを主成分とする区分が溶出し、脱溶媒後24.7gのホスファチジルコリンを得た。ホスファチジルコリン区分の判定は薄層クロマトグラフィー(展開溶媒: クロロホルム-メタノール-水 65/25/4, vol/vol/vol)で行った。薄層クロマトグラフィー上のRf値0.20~0.30(ホスファチジルコリン)にシング

ルスボットのみが認められる分画を集めて、窒素気流下で脱溶媒を行い、純ホスファチジルコリンを15.1g得た。

【0039】その結果、ドコサヘキサエン酸は30%で、バルミチン酸、オレイン酸が各約20%を占めていた。このホスファチジルコリンをホスホリバーゼA₂で加水分*

*解し、三沸化ホウ素メタノール法でメチルエステル化し、キャビラリーカラムガスクロマトグラフィーで脂肪酸組成を測定した。その結果、ドコサヘキサエン酸は61%であり、オレイン酸が30%、その他に数本の微小ピークが認められた。

フロントページの続き

(72)発明者 桜井 成

東京都杉並区南荻窪1丁目33番12号

(72)発明者 旭 健一

埼玉県和光市諏訪原団地1-4-108

(72)発明者 高橋 信孝

東京都杉並区荻窪4丁目27番2号